

ANÁLISIS NO DIRIGIDO DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS VARIEDADES DE MANDARINO CLEMENULES Y CLEMENPONS

^a Centro de Citricultura y Producción Vegetal del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada (Valencia, Spain).

^b Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC - Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain.

(*e-mail: gonzalez_mde@gva.es).
Contratada por la Fundación AgroAlimed

INTRODUCCIÓN

El perfil volátil del aceite esencial de clementinas es semejante cualitativa y cuantitativamente a otros cítricos como naranjas (*Citrus sinensis*) (Viuda-Martos *et al.*, 2009), aunque hay que tener en cuenta que sólo se pueden comparar variedades cultivadas en condiciones similares (Fanciullino *et al.*, 2006). Las mandarinas, de donde proceden las clementinas, están clasificadas en más de 30 especies, de acuerdo con el sistema establecido por Tanaka (1961). Estas especies están compuestas por entre una y varias decenas de variedades, en ocasiones muy difíciles de diferenciar morfológicamente. Dado que la variabilidad química del aceite esencial de la corteza de los cítricos depende de los factores genéticos, el estudio químico de dicho aceite ayuda a diferenciar estas variedades (Ruberto *et al.*, 1997; Merle *et al.*, 2004).

Los compuestos más abundantes del aceite esencial de las clementinas, y en general de los cítricos, son compuestos de origen terpenico de bajo peso molecular, esto es, monoterpenos y sesquiterpenos, compuestos de

10 y 15 átomos de carbono, respectivamente (Ruberto *et al.*, 1997; Dugo y col., 2002; Merle *et al.*, 2004). Estos terpenos representan aproximadamente el 95% de todo el aceite esencial, siendo el monoterpeno limoneno el compuesto mayoritario (alrededor del 92% del total) (Merle *et al.*, 2004; González-Mas *et al.*, 2010). Otros monoterpenos hidrocarbonados importantes en el aceite esencial de mandarinas son α - y β -pineno, α - y γ -terpineno, camfeno, sabineno, β -mirceno, α -felandreno, 3-careno, y otros. También destacan otros monoterpenos con funciones oxigenadas, como el alcohol linalool o *trans*-carveol, los aldehídos citronellal o neral y la cetona carvona. En cuanto a los sesquiterpenos identificados en los aceites esenciales de cítricos, encontramos tanto hidrocarbonados (por ejemplo α -copaeno o α -humuleno) como oxigenados con algún grupo funcional tipo cetona, alcohol o aldehído como *cis*-nerolidol o α - y β -sinensal. Otros compuestos no pertenecientes al grupo de los terpenos también se suelen identificar en los aceites esenciales de cítricos, como compuestos alifáticos de más de cinco átomos de carbono, derivados de la degradación de los ácidos grasos. Ejemplos de estos últimos son el *trans*-2-hexenal, muy frecuente en el aceite esencial de los cítricos y responsable del aroma a hierba fresca (González-Mas *et al.*, 2010) o los aldehídos octanal y decanal, que le proporcionan un aroma a grasa (Cornell University, 2004). También se ha descrito en estos aceites el compuesto α -ionona que pertenece al grupo de los norisoprenoides (Viuda-Martos *et al.*, 2009).

Se han descrito numerosas actividades biológicas de estos aceites de

cítricos, tales como antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (Chutia *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). También se usan frecuentemente en la industria alimentaria y en cosmética y perfumería. En cuanto a su función fisiológica, los aceites esenciales tienen funciones de defensa contra patógenos y herbívoros, y de atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas (Bruneton, 2001).

El presente trabajo se centra en el estudio comparativo de los compuestos volátiles que integran el aceite esencial del flavedo de los frutos de dos variedades de clementinas, la variedad Clemenules y la variedad Clemenpons. Ambas son variedades cuyos frutos son morfológicamente indistinguibles, ya que son muy semejantes en cuanto al tamaño, peso, diámetro, relación diámetro/altura, tamaño de la corteza, color, porcentaje de zumo y ausencia de semillas. Su periodo de cosecha también es muy semejante, aunque Clemenpons es más temprana, ya que suele adelantarse quince días respecto a Clemenules y su campaña finaliza también dos o tres semanas antes (Soler-Aznar *et al.*, 2006). Hasta ahora, ninguna investigación realizada había permitido distinguir los frutos de ambas variedades. A nivel popular, los agricultores siempre han afirmado que la corteza de los frutos de la variedad Clemenpons tiene un aroma anisado que no se logra percibir en la de la variedad Clemenules. En un trabajo previo de los participantes de este trabajo se consiguió diferenciar el aroma del aceite esencial de Clemenules y Clemenpons del de otras variedades de mandarinas como Arrufatina y Clemensol, pero fue imposible distinguir

entre estas dos primeras variedades (González-Mas *et al.*, 2010). Para dicho trabajo se comparó el aceite esencial de los frutos de todas estas variedades durante una sola campaña y en una sola localización, y en él se pudo apreciar que los aceites esenciales de Clemenules y Clemenpons tienen un alto porcentaje del monoterpeno limoneno, de alrededor de un 94%, así como porcentajes inferiores al 1,5% de otros terpenos, principalmente monoterpenos, como sabineno.

El objetivo de este trabajo ha sido, por tanto, establecer si es posible diferenciar los aceites esenciales de los frutos de Clemenules y Clemenpons y, en el caso de que así fuera, identificar los compuestos volátiles responsables de esa diferencia. Para ello se ha realizado un estudio metabolómico no dirigido del perfil volátil de estos aceites, empleando muestras recogidas no sólo durante una campaña (como en el trabajo anteriormente citado) sino durante dos años consecutivos y en dos localizaciones diferentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Vegetal

En 2009 los frutos fueron recogidos a partir de árboles de Clemenules y Clemenpons (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) situados en la parcela número 5 (P5) de la Estación Experimental del *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias* (IVIA), situada en Moncada, Valencia. En el segundo año del ensayo, 2010, los frutos fueron recogidos a partir de la misma parcela del año anterior, así como a partir de otra parcela perteneciente a la colección de germoplasma (BG) de la estación experimental del IVIA. Esta estación tiene un clima Mediterráneo (lluvia total de 429 mm en el año 2009 y 391 mm en el año 2010 y una temperatura media de 14,8 y 12,5 °C entre octubre y diciembre de 2009 y 2010, respectivamente). Los árboles de ambas variedades crecieron bajo las mismas condiciones ambientales, de suelo y de prácticas

agrícolas y de orientación, ya que ambas presentan la orientación de las filas de árboles N-S y la de las caras de los árboles E-O. No obstante, en el banco de Germoplasma los árboles están más separados entre sí, con lo cual la influencia de la orientación en el desarrollo del árbol y sus frutos es menos importante que para los árboles de la P5.

Toma de muestras

En 2009, los frutos de Clemenules y Clemenpons fueron recogidos durante ocho días diferentes a partir de la parcela 5: 7/10/2009, 20/10/2009, 27/10/2009, 3/11/2009, 10/11/2009, 18/11/2009, 25/11/2009 y 2/12/2009 (para esta última fecha solo se tomaron muestras de Clemenules, porque ya se había acabado la campaña para Clemenpons). Los frutos de Clemenules y Clemenpons en 2010 fueron recogidos durante siete días diferentes, tanto en la parcela 5 como en el banco de germoplasma: 21/10/2010, 28/10/2010, 3/11/2010, 11/11/2010, 18/11/2010, 25/11/2010 y 2/12/2010. Cada día de recogida se tomaban aproximadamente 15 frutos por variedad y por localización, procedentes de tres árboles por variedad para la Parcela 5 y de dos árboles por variedad para el Banco de Germoplasma.

Una vez en el laboratorio, se preparaban dos muestras por cada variedad y también, solo en 2010, por cada localización. Para la obtención de cada muestra se tomaban cinco frutos de cada variedad de un peso medio de 80 g, sin ningún daño aparente y de manera aleatoria. A partir de estos cinco frutos se cortaban cerca de 50 gramos de corteza, en trozos de aproximadamente 4 cm², a los cuales se les eliminaba el albedo con ayuda de una cuchilla, quedando solo el flavedo, que a continuación se introducía en un frasco de plástico para su congelación a -80 °C hasta la extracción del aceite esencial, que se realizaba como máximo en los seis días siguientes a su recogida. Cada frasco pasaba a ser considerado ya una muestra. Así

pues, durante 2009 se obtuvieron 30 muestras, cuatro muestras (dos de cada variedad) por día de recogida (8 fechas), menos el último día que solo se recogieron dos muestras para Clemenules. Durante 2010 se obtuvieron 56 muestras, ocho muestras (cuatro de cada variedad) por día de recogida (7 fechas), ya que procedían de dos localizaciones diferentes.

Obtención del aceite esencial

En el momento de la extracción del aceite esencial el material de cada frasco fue descongelado a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se introdujo en un matraz redondo de 250 mL. Se añadieron 120 mL de agua destilada a cada matraz, que se acopló a un sistema de destilación Clevenger (Figura 1, pág. 238). Cada matraz se calentó a 60 °C durante tres horas. Al cabo de este periodo se recogió la muestra del aceite, normalmente de 0,5 mL de volumen. El rendimiento de todas las extracciones osciló entre el 1,0-1,1% (mL/100g de peso fresco flavedo). Estas muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta el momento de su análisis. Se realizaron 86 análisis en total, uno de cada una de las muestras.

Análisis del aceite esencial mediante Cromatografía de Gases acoplada al Espectrómetro de Masas, previa concentración del mismo mediante la técnica de espacio en cabeza-microextracción en fase sólida (HS-SPME)

Las muestras de aceite fueron inicialmente diluidas 1:100 con diclorometano, para lo cual se diluyeron 4 µL de aceite esencial en 396 µL de diclorometano. A continuación se tomaron 10 µL de esta solución y se introdujeron en un vial de espacio de cabeza de 10 mL con tapón de rosca junto con 990 µL de agua mili-Q. La concentración final de aceite esencial en estos viales fue, por tanto, de 100 nL/mL, esto es, 100 ppm. Los compuestos volátiles se capturaron por microextracción en fase sólida a partir del

espacio de cabeza de estos viales (*HS-SPME*). Para ello se incubaron las muestras a 50 °C durante 10 min en agitación (500 rpm). Luego se introdujo en el vial la fibra de SPME (con un recubrimiento de 65 µm de grosor de una mezcla de divinilbenceno y polidimetilsiloxano) durante 20 min, en las mismas condiciones de agitación y temperatura que la incubación. Finalmente, los volátiles adsorbidos en la fibra se desorbieron a 250 °C durante 1 min en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases (6890N), el cual estaba acoplado al espectrómetro de masas 5975B (ambos de la marca Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) equipado con un automuestreador COMBI-PAL (CTC Analytics, Zwingen, Suiza). Posteriormente a la desorción de la fibra, ésta se introdujo en una estación de acondicionamiento a 250 °C durante otros 5 min a fin de evitar contaminaciones cruzadas.

Para el cromatógrafo de gases se utilizó una columna capilar J&W Scientific DB-5ms de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 1 µm de espesor de la fase estacionaria, constituida ésta última por un 5% de fenilpolisiloxano y un 95% de dimetilsiloxano (Agilent Technologies). El tiempo de análisis fue de 49 min, con una temperatura inicial del horno de 40 °C durante 2 min, luego se aumentó la temperatura 5 °C por min hasta alcanzar los 250 °C, manteniéndose así durante 5 min. El flujo de Helio fue de 1,2 mL/min. En cuanto al detector de Masas, se trabajó en modo impacto electrónico, con 70 eV de energía de ionización y 230 °C de temperatura de la fuente de ionización. La adquisición fue llevada a cabo en modo *scan*, haciéndose un barrido entre las masas de 35 a 220 m/z (siete *scans* por segundo). Los cromatogramas y los espectros de masas fueron registrados mediante el software *Enhanced ChemStation Data Analysis* para CG-EM (Agilent). La totalidad de los picos cromatográficos fueron procesados mediante un análisis no dirigido con el software *MetAlign* (desarrollado en Wageningen UR,

Holanda). Dicho procesamiento consistió en el alineamiento de todos los cromatogramas y posterior cuantificación de todos los compuestos volátiles mediante la altura de los picos de cada uno de los iones de sus espectros de masas, tanto correspondientes a compuestos conocidos como desconocidos. Posteriormente al análisis estadístico multivariante de estos datos, para aquellos picos que se consideraron de particular interés, es decir, los más diferentes entre ambas variedades, se hizo una segunda cuantificación más precisa en base al área de estos picos mediante el software *Enhanced ChemStation Data Analysis* con posterior revisión manual de cada pico (ver cuantificación de los compuestos).

Identificación de los compuestos

Los compuestos se consideraron identificados de forma inequívoca cuando su espectro de masas se correspondía al de ese compuesto en la base de datos de espectros de masas NIST 05 (*National Institute of Standards and Technology*) y además su tiempo de retención fue el mismo que el de su correspondiente patrón comercial inyectado en las mismas condiciones cromatográficas que las muestras. Los patrones fueron comprados a las empresas Sigma-Aldrich Química (Madrid) y Extrasynthese (Francia). Algunos compuestos fueron exclusivamente identificados por la homología de su espectro de masas con el de los compuestos en la base de datos NIST 05 (Tabla 1 y Tabla 2), ya que son productos que no están disponibles comercialmente; por lo tanto su identificación debe ser considerada como tentativa.

Cuantificación de los compuestos

Como es habitual en trabajos de metabolómica, se hizo una cuantificación relativa de los compuestos, esto es, los resultados de una muestra en particular se expresaron como la razón de los niveles de cada uno de los metabolitos detectados en esa muestra respecto a los niveles de

cada uno de ellos en una muestra de referencia analizada en el mismo ensayo. Para las muestras de 2009 se tomó como referencia la muestra Clemenules P5-1 (la réplica biológica nº1 de Clemenules recolectada más temprana en la parcela 5 de ese año, eso es, el día 7/10/2009). Para las de 2010 se tomó como referencia la muestra Clemenules BG-1 (la réplica biológica nº1 de Clemenules recolectada más temprana en la parcela Banco de Germoplasma de ese año, eso es, el día 21/10/2010). Esta muestra de referencia se inyectó regularmente cada 5-6 muestras a lo largo de todo el ensayo, y fue utilizada para corregir los sesgos debidos a las oscilaciones en la sensibilidad por deriva del detector y, sobre todo, las debidas al envejecimiento de la fibra.

Para el análisis del cromatograma con *MetAlign* se utilizaron todos los iones del espectro de masas de cada compuesto. Para el análisis con *Enhanced ChemStation Data Analysis* de los picos seleccionados se escogió un ión con relación masa/carga (*m/z*) específico para cada compuesto. Se seleccionó aquel ión que fuera lo suficientemente específico como para permitir una buena integración en esa región del cromatograma y que tuviera la mejor relación señal/ruido.

Análisis estadístico

Dada la gran complejidad de la información extraída de los cromatogramas mediante el abordaje no dirigido (más de 11000 datos para cada cromatograma), para su interpretación se recurrió a análisis multivariante. Inicialmente se realizó un análisis de componentes principales (PCA), tanto de todas las muestras juntas como de cada año por separado. Posteriormente también se hicieron tres análisis PLS-DA (análisis de mínimos cuadrados parciales o proyección de estructuras latentes-análisis discriminante), uno incluyendo todas las muestras del 2009 y del 2010, otro incluyendo todas las muestras del 2009 y el último con todas las muestras del 2010.

Sigue en pág. 236 ▶

En ambos tipos de análisis, la razón de los niveles de cada uno de los metabolitos detectados en cada muestra respecto a los niveles de cada uno de ellos en la muestra de referencia fue transformada con el logaritmo en base 2. La normalización para los análisis PCA y PLS-DA fue *Pareto*. Para todos estos análisis se usó la versión SIMCA-P version 11 (Umetrics, Umea, Suecia). Una vez se consiguió identificar los metabolitos diferenciales entre las dos variedades, se hizo un análisis estadístico *t* de Student para ver la significación estadística de las diferencias encontradas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de determinar si existían diferencias entre los aceites esenciales de *Clemenules* y *Clemenpons*, en el presente trabajo se analizaron muestras de ambas variedades procedentes de dos campañas consecutivas. En la primera campaña se tomaron muestras solo de una localización y en la segunda campaña se tomaron muestras de árboles en dos localizaciones diferentes. El abordaje del estudio de los 86 cromatogramas correspondientes se llevó a cabo mediante un análisis no dirigido de todos los picos cromatográficos (más de 11000 datos *-features-* por cromatograma). El término "no dirigido" significa que todos los datos y, por lo tanto, todas las señales (picos de iones) detectados a partir de los cromatogramas de ambas variedades fueron tenidos en cuenta, sin ningún tipo de discriminación previa ni descarte, independientemente de la posibilidad o no de identificar los compuestos correspondientes a estas señales. Este estudio permitió generar una tabla de datos con la altura de cada uno de los picos (iones) obtenidos a partir de todos los cromatogramas, corrigiendo pequeñas oscilaciones de los tiempos de retención de los picos en cada una de las muestras, ya que este programa se encarga de alinear los cromatogramas. Dada la gran cantidad de datos obtenidos mediante el programa *MetAlign* no se realizó un estudio estadístico convencional, ya

que el número de variables (*features*) era extraordinariamente elevado. Para la correcta interpretación de tal volumen de datos fue necesario recurrir a análisis estadísticos multivariantes, cuyos resultados se describen en los dos siguientes apartados.

Análisis de Componentes Principales (PCA)

En primer lugar se realizó un análisis de componentes principales PCA con todas las muestras objeto de estudio. Al estudiar dicho PCA se observó una tendencia de las muestras a separarse por variedades en la mayoría de los ensayos, aunque no era posible separarlas totalmente, por lo que dicho análisis no fue concluyente (Figura 2, pág. 238). Este análisis no fue determinante debido a la gran cantidad de parámetros introducidos: dos años de recolección (2009/2010), dos variedades de frutos (*Clemenules*/*Clemenpons*), varios estadios de maduración (1-8 en 2009; 1-7 en 2010) y dos parcelas en la cosecha del año 2010: Parcela 5 (P5)/ Banco de Germoplasma (BG).

Por ello se procedió a la realización de dos PCAs diferentes para las muestras recolectadas cada año. La Figura 3 (pág. 238) muestra el PCA con las muestras recolectadas en el año 2009 y la figura 4 el PCA con las muestras recolectadas en el año 2010, ambos normalizadas a varianza unitaria, por lo que todos los compuestos tuvieron la misma importancia a la hora de hacer el análisis, tanto los de mayor dispersión entre las dos variedades como los de menor dispersión (Jolliffe, 2002). En el PCA del 2009 (Figura 3), en el que se incluyen todas las muestras de ese año, correspondientes únicamente a la parcela 5 (P5), se observa perfectamente que la segunda componente (PC2) separa la variedad *Clemenules* de la *Clemenpons* y explica el 14,3 % de la varianza de los datos, es decir, que solo el 14,3% de la varianza existente en las muestras del 2009 permitía diferenciar ambas variedades.

Sin embargo, al realizar el PCA con las muestras del año 2010, en el que se incluyen los datos de dos localizaciones diferentes (P5 y banco de germoplasma), no es posible encontrar una componente que distinga ambas variedades (Figura 4, pág. 238).

A la vista de estos estudios metabolómicos se puede concluir que el PCA es una herramienta estadística lo suficientemente potente como para separar las variedades *Clemenules* y *Clemenpons*, en función de su contenido en compuestos volátiles y de muestras recolectadas en el año 2009 en la parcela 5. Sin embargo no es útil para distinguir ambas variedades al año siguiente, al proceder las muestras de dos parcelas diferentes.

Proyección de Estructuras Latentes y Análisis Discriminante (PLS-DA)

Con el fin de obtener un análisis estadístico más concluyente que con el PCA, se decidió realizar un análisis de mínimos cuadrados parciales o proyección de estructuras latentes (PLS) combinado con un análisis discriminante (DA) y utilizando una varianza tipo *Pareto* (Jolliffe, 2002). Un análisis PLS-DA es un análisis en el que se crea una nueva variable, llamada variable latente, que facilita encontrar las diferencias entre dos matrices de datos, en este caso, los datos de los cromatogramas de *Clemenules* y los datos de los cromatogramas de *Clemenpons* (la altura de los picos de los iones de los compuestos). Para este estudio PLS-DA esta nueva variable fue el tipo de variedad y a cada una de las dos variedades se le dio un valor. Esto supone que cuando se hace un análisis PLS-DA se utiliza información sobre las posibles tipos de muestras *a priori* (en este caso el tipo de variedad de cada muestra), es decir, en el análisis PLS-DA se utiliza conocimiento previo para identificar cuales son los factores que contribuyen a separar las dos clases predefinidas, lo cual no se hace en el PCA. En este análisis se utilizó una varianza de tipo *Pareto*, y no varianza unitaria, para que los

compuestos con mayor dispersión de datos entre ambas variedades tuvieron más importancia que los compuestos con menor dispersión de datos a la hora de determinar las diferencias, pero sin anular totalmente la influencia de estos últimos en los resultados de este análisis estadístico (Jolliffe, 2002).

Al estudiar el PLS-DA con todas las muestras juntas del 2009 y del 2010 se observó que no era posible separarlas totalmente según la variedad (Figura 5, pág. 238). No obstante, cuando se hizo un PLS-DA con los datos de cada año de forma independiente se observó que era posible diferenciar las muestras de ambos tipos de variedades por su contenido en compuestos volátiles, tanto en el año 2009 como en el año 2010 (Figura 6 y Figura 7, pág. 238).

El PLS-DA de los datos obtenido a partir de las muestras del año 2009 mostró que la combinación de la primera componente (PC1), que explicaba el 12% de la varianza de los datos, con la segunda (PC2), que explicaba el 6,9% de la varianza, permitía distinguir perfectamente entre ambas variedades (Figura 6). En este caso ambas componentes estaban rotadas aproximadamente 30 grados.

El PLS-DA realizado con los datos procedentes de las muestras recolectadas en el año 2010, tanto en la parcela 5 como en el Banco de Germoplasma, fue capaz de separar perfectamente ambas variedades a través de la combinación de la primera componente (PC1), que explicaba el 12,8% de la varianza de los datos, con la segunda componente (PC2), que explicaba el 7,4% de la varianza (Figura 7). Como en el caso anterior, las componentes aparecían rotadas.

Identificación de los compuestos diferenciales entre la variedad Clemenules y Clemenpons

Una vez obtenido un análisis estadístico capaz de diferenciar metabóli-

camente los aceites esenciales de ambas variedades, se procedió a la identificación de los compuestos volátiles responsables de estas diferencias, tanto en las muestras recolectadas en el año 2009 como en las del año 2010. Solamente aquellos compuestos diferenciales que fueron comunes en ambos años, se consideraron como diferenciadores de cada uno de los dos tipos de aceites esenciales. Las diferencias entre los compuestos volátiles fueron de tipo cuantitativo y no de tipo cualitativo, es decir, ambos aceites contenían los mismos compuestos volátiles, pero algunos de estos compuestos tenían distinta concentración según la variedad.

Compuestos volátiles más abundantes en el flavedo de Clemenpons que en el de Clemenules

La tabla 1 muestra los quince compuestos volátiles que estaban en mayor concentración en el aceite esencial de Clemenpons que en el de Clemenules. En dicha tabla también

se indica el ratio entre la abundancia de dichos compuestos en el aceite esencial de Clemenpons (medida como altura de los picos de los iones) y la abundancia de los mismos en el aceite esencial de Clemenules.

Diez de estos compuestos diferenciales son de naturaleza monoterpénica, estando presentes en los aceites de Clemenpons en una cantidad entre 3,3 y 1,3 veces superior que en los aceites de Clemenules (Tabla 1). En concreto, tres de ellos son los monoterpenos hidrocarbonados 3-careno, α -terpineno y γ -terpineno, mientras que los otros siete son monoterpenos oxigenados, de los cuales se han identificado sin ambigüedad dos de ellos, el *trans*-carveol y el acetato de α -terpinilo, y un tercer compuesto, *p*-ment-1-en-9-al, que se ha identificado tentativamente solo por su espectro de masas, ya que no existe el patrón comercial (Figuras 8 y 9, pág. 239).

Tabla 1. Compuestos más abundantes en Clemenpons que en Clemenules.

Nombre del compuesto	Tr (min)	Tipo de compuesto ^a	Olor según Flavornet ^b	Ratio Clemenpons/Clemenules ^c
3-careno	24,31	mt hdc	limón	1,44 ± 0,36
α -terpineno	24,55	mt hdc	limón	1,26 ± 0,29
γ -terpineno	25,93	mt hdc	turpentina (pino)	1,43 ± 0,39
no identificado	28,16	mt oxig	-	2,79 ± 1,89
no identificado	28,91	mt oxig	-	3,32 ± 2,79
<i>trans</i> -carveol	31,29	mt alc	alcaravea (anís)	2,11 ± 0,79
<i>p</i> -ment-1-en-9-al ^d	31,47	mt ald	-	1,91 ± 0,80
no identificado	33,49	mt oxig	-	2,03 ± 0,97
acetato de α -terpinilo	34,98	mt est	cera	1,68 ± 0,51
no identificado	36,64	mt oxig	-	1,71 ± 0,55
no identificado	38,64	sq hdc	-	1,13 ± 0,15
α -humuleno	38,71	sq hdc	madera	1,12 ± 0,18
no identificado	39,40	sq hdc	-	1,62 ± 0,49
no identificado	39,89	sq hdc	-	1,43 ± 0,41
α -sinensal ^d	43,90	sq ald	fresco, dulce	1,83 ± 0,45

^a mt hdc= monoterpeno hidrocarbonado; mt oxig= monoterpeno con función oxigenada; mt alc= monoterpeno alcohólico; mt ald= monoterpeno aldehídico; mt est= monoterpeno esterificado; sq hdc= sesquiterpeno hidrocarbonado; sq ald= sesquiterpeno aldehídico.

^b Cornell University, 2004.

^c Las medias de las abundancias para cada uno de los compuestos mostraron diferencias significativas entre ambas variedades, $p < 0,05$, según *t* de Student.

^d Compuesto detectado tentativamente. Tr= tiempo de retención.



Figura 1. Extracción de tipo Clevenger.

Figura 2. Análisis de PCA con los datos obtenidos a partir de las muestras de 2009 y 2010.

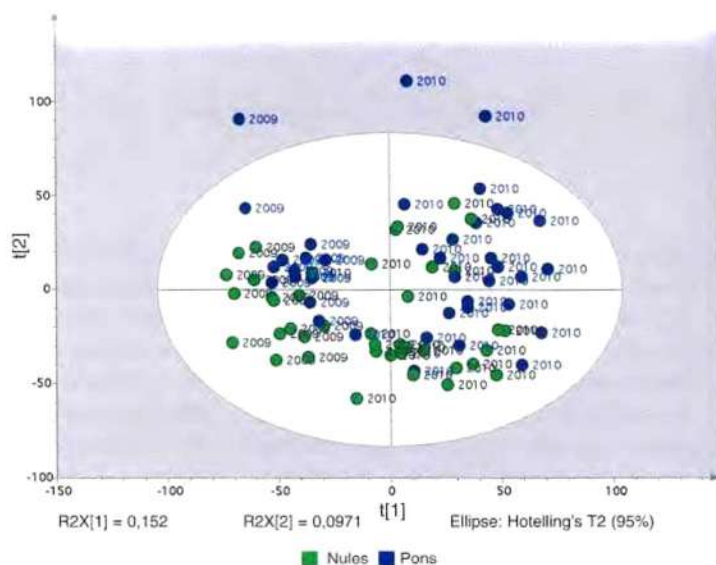


Figura 3. Análisis de PCA con los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2009. 1-7 son los estados de maduración de menos (1) a más maduración (7), el (8) no se mostró.

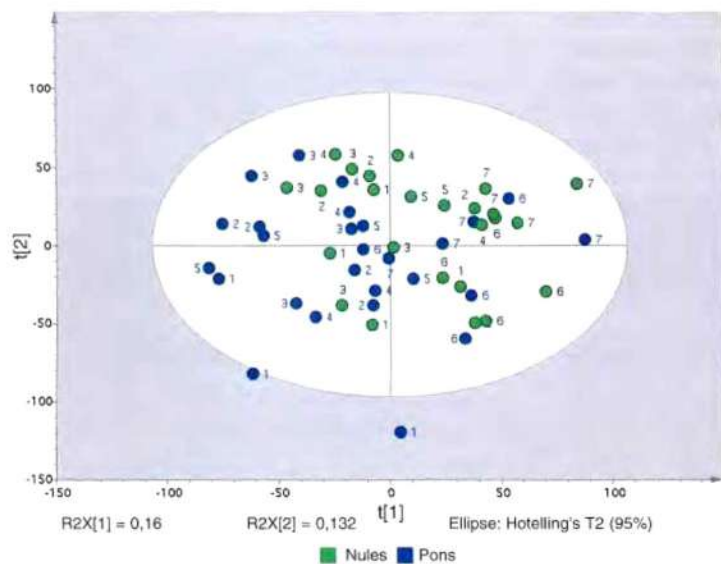
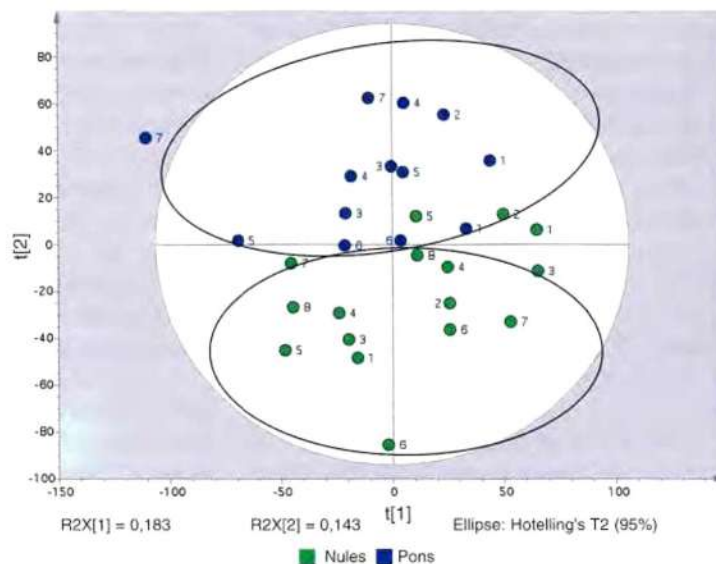


Figura 4. Análisis de PCA con los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2010. 1-7 son los estados de maduración de menos (1) a más maduración (7).

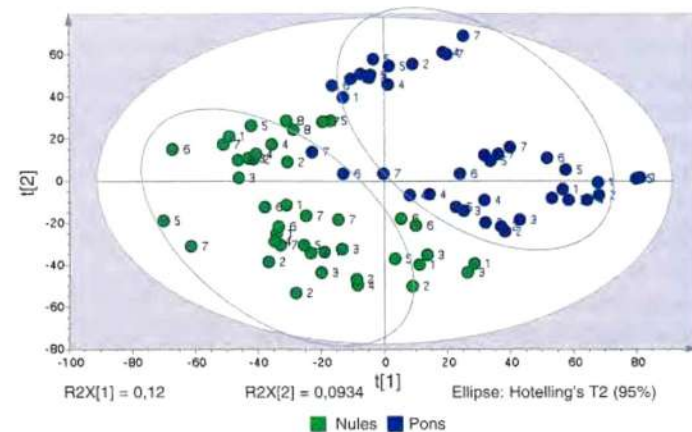


Figura 5. Análisis PLS-DA de los datos obtenidos a partir de las muestras del 2009 y del 2010. 1-8 son los estados de maduración de menos (1) a más maduración (8).

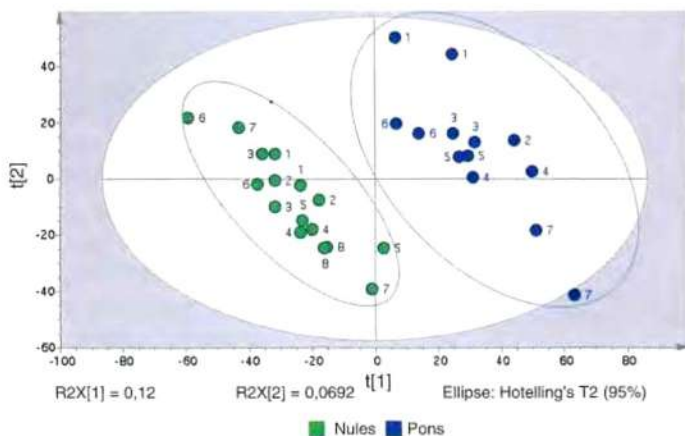


Figura 6. Análisis PLS-DA de los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2009. 1-8 son los estados de maduración de menos (1) a más maduración (8).

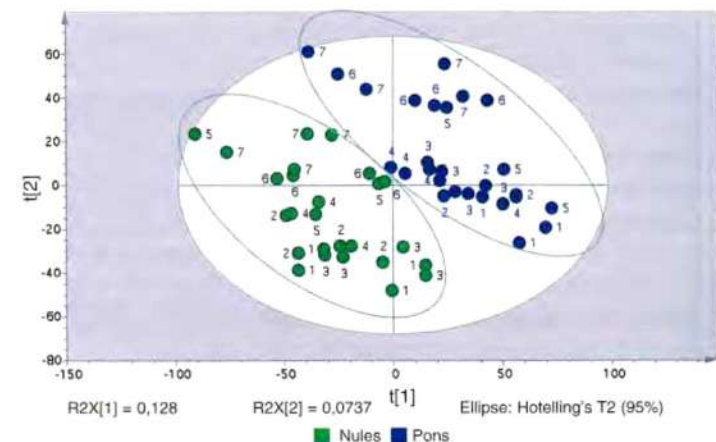


Figura 7. Análisis PLS-DA de los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2010. 1-7 son los estados de maduración de menos (1) a más maduración (7).

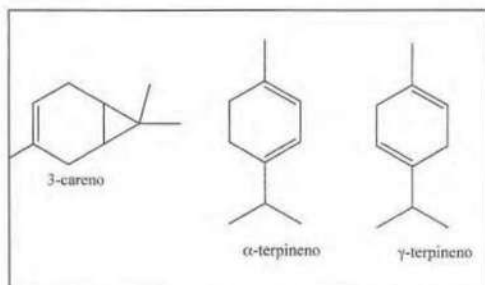


Figura 8. Monoterpenos hidrocarbonados identificados.

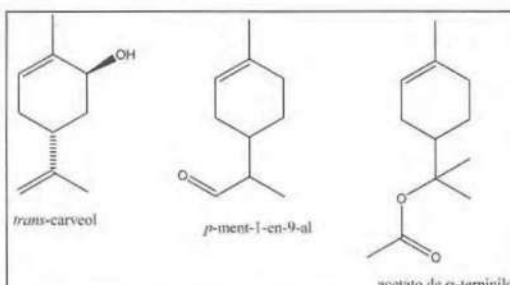


Figura 9. Monoterpenos oxigenados identificados.

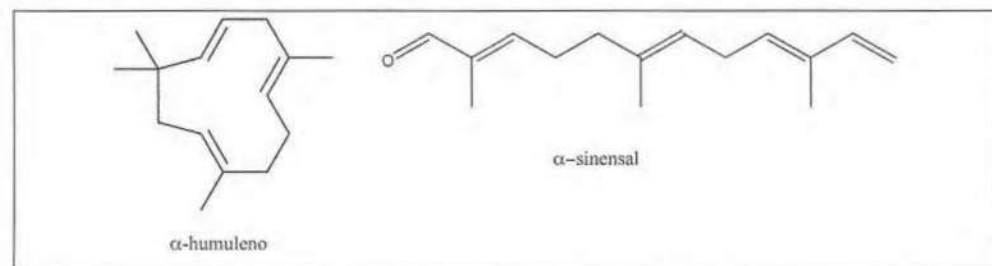


Figura 10. Sesquiterpenos identificados.

El resto de compuestos diferenciales son sesquiterpenos. Este tipo de terpenos poseen quince átomos de carbono, frente a los diez átomos de carbono que forman los monoterpenos, de ahí que los sesquiterpenos sean menos volátiles y tengan un tiempo de retención mayor en los análisis cromatográficos que los monoterpenos (Tabla 1). De los cinco sesquiterpenos más abundantes en Clemenpons que en Clemenules, cuatro son hidrocarbonados, de los cuales solo se ha podido identificar sin ambigüedad el α -humuleno. El quinto sesquiterpeno es aldehídico, el α -sinensal, que ha podido ser identificado únicamente en base a su espectro de masas comparándolo con el de la NIST, ya que no existe su patrón de forma comercial (Figura 10). Estos cinco compuestos sesquiterpénicos no llegan a duplicar su concentración en Clemenpons con respecto a Clemenules, de acuerdo con el ratio mostrado en la tabla 1.

De acuerdo los compuestos que han sido detectados en mayor abundancia en el aceite de Clemenpons que en el de Clemenules (Tabla 1), se observa que el aceite esencial de la variedad Clemenpons es más rico que el de Clemenules en determinados

monoterpenos y sesquiterpenos. Los compuestos monoterpénicos α -terpineno y γ -terpineno, ambos hidrocarbonados y monocíclicos (Figura 8) y más abundantes en Clemenpons, se suelen identificar en todos los análisis de aceites esenciales de cítricos (Ruberto *et al.*, 1997; Lota *et al.*, 2001; Merle *et al.*, 2004; Njoroge *et al.*, 2005; Lan Phi *et al.*, 2006; Boussaada y Chemli, 2007; Viuda-Martos *et al.*, 2009; Omori *et al.*, 2011; Deterre *et al.*, 2012; Bourgou *et al.*, 2012; Tomiyama *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2014; Wang y Liu, 2014). Ambos compuestos proporcionan al aceite esencial un aroma típico de limón, de acuerdo con la base de datos de Flavor.net (Cornell University, 2004) (Tabla 1). El compuesto 3-careno, hidrocarbonado y bicíclico (Figura 8), también más abundante en Clemenpons, no ha sido identificado tan frecuentemente en el aceite esencial de cítricos, aunque proporciona un aroma parecido a los dos anteriores compuestos, según Flavor.net (Ruberto *et al.*, 1997; Lota *et al.*, 2001; Högnadóttir y Rouseff, 2003; Bourgou *et al.*, 2012; Tomiyama *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013).

En cuanto a los dos monoterpenos oxigenados identificados sin ambigüedad y más abundantes en Clemen-

pons que en Clemenules, el acetato de α -terpinilo y el *trans*-carveol (Figura 9), ambos monocíclicos, proporcionan aromas diferentes a los tres monoterpenos hidrocarbonados citados anteriormente, según Flavor.net (Tabla 1). Así, el acetato de α -terpinilo, que ha sido identificado en pocos aceites esenciales de cítricos (Ruberto *et al.*, 1997; Högnadóttir y Rouseff, 2003; Bourgou *et al.*, 2012), tiene un aroma a cera. El *trans*-carveol, identificado en más ocasiones (Minh Tu *et al.*, 2002; Högnadóttir y Rouseff, 2003; Njoroge *et al.*, 2005; Lan Phi *et al.*, 2006; Viuda-Martos *et al.*, 2009; Omori *et al.*, 2011; Cheong *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015), tiene un aroma a alcaravea (*Carum carvi*) que es una planta aromática que se suele emplear como condimento alimentario y que presenta un aroma semejante al anís (Cornell University, 2004). Este aroma a alcaravea del *trans*-carveol, junto con el hecho de que este compuesto duplica su abundancia en el aceite de Clemenpons con respecto al aceite de Clemenules (Tabla 1), podría explicar por qué los agricultores afirman que la corteza del fruto de Clemenpons tiene un aroma anisado que no logran percibir en los frutos de Clemenules.

En referencia a los dos únicos sesquiterpenos más abundantes en Clemenpons que en Clemenules que han podido ser identificados en este ensayo, el α -humuleno y el α -sinensal (Figura 10), ambos han sido detectados muy frecuentemente en el aceite esencial de cítricos (Ruberto *et al.*, 1997; Lota *et al.*, 2001; Min Tu *et al.*, 2002; Chisholm *et al.*, 2003a; Merle *et al.*, 2004; Njoroge *et al.*, 2005; Fanciullino *et al.*, 2006; Lan Phi *et al.*, 2006; Boussaada y Chemli, 2007; Bourgou *et al.*, 2012; Deterre *et al.*, 2012; Liu y col., 2012; Costa y col., 2014; Wan y Liu, 2014). El α -humuleno, monocíclico, tiene un aroma a madera, y el α -sinensal, de estructura lineal, tiene un aroma fresco y dulce (Cornell University, 2004).

Compuestos volátiles más abundantes en el flavedo de Clemenules que en el de Clemenpons

La tabla 2 muestra los cinco compuestos volátiles que estaban en mayor concentración en el aceite esencial de Clemenules que en el de Clemenpons. En dicha tabla también se indica el ratio entre la abundancia de dichos compuestos en el aceite esencial de Clemenpons y la abundancia de los mismos en el aceite esencial de Clemenules. Estos metabolitos diferenciales son todos alifáticos de ocho o más átomos de carbono. En concreto se trata de los alcoholes 1-octanol y 1-decanol y los aldehídos dodecanal, tetradecanal y pentadecanal (Figura 11); los dos últimos compuestos solo han podido ser identificados de forma tentativa por su espectro de masas. Su abundancia en los aceites de Clemenpons es entre un 39 y un 9% inferior que en los aceites de Clemenules, aproximadamente (Tabla 2).

De acuerdo con estos resultados, el flavedo de la variedad Clemenules parece más rico en compuestos alifáticos que el flavedo de la variedad Clemenpons. Los alcoholes 1-octanol y el 1-decanol, más abundantes en Clemenules, emiten un aroma a musgo y a grasa, respectivamente (Cornell University, 2004). El primero se ha identificado en muchas ocasiones en el aceite esencial de cítricos (Ruberto *et al.*, 1997; Lan Phi *et al.*, 2006; Cheong *et al.*, 2011; Bourgo y col., 2012; Deterre *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Tomiyama *et al.*, 2012), mientras que el 1-decanol se ha identificado en pocas ocasiones (Liu *et al.*, 2012; Tomiyama *et al.*, 2012). Los aldehídos dodecanal, tetradecanal y pentadecanal, también mas abundantes en Clemenules que en Clemenpons (Figura 11) se han identificado en muchas ocasiones en los aceites esenciales de cítricos, aunque en mucha mayor medida el primero de ellos (Ruberto *et al.*, 1997; Högnadóttir y Rouseff, 2003; Njoroge *et al.*, 2005; Lan Phi *et al.*, 2006; Miyazawa *et al.*, 2010;

Tabla 2. Compuestos más abundantes en Clemenules que en Clemenpons.

Nombre del compuesto	Tr (min)	Tipo de compuesto ^a	Olor según Flavornet ^b	Ratio Clemenpons/Clemenules ^c
1-octanol	25,90	alcohol	musgo, nuez, setas	0,91± 0,32
1-decanol	32,39	alcohol	grasa	0,83 ± 0,38
dodecanal	36,43	aldehído	grasa ^d	0,72 ± 0,22
tetradecanal ^e	41,67	aldehído	grasa, madera ^f	0,61 ± 0,19
pentadecanal ^e	46,58	aldehído	fresco, floral ^f	0,65 ± 0,31

^a Todos son alifáticos.

^b Cornell University, 2004.

^c Las medias de las abundancias para cada uno de los compuestos mostraron diferencias significativas entre ambas variedades, $p < 0.05$, según t de Student.

^d Miyazawa *et al.*, 2010.

^e Compuesto detectado tentativamente.

^f Chisholm *et al.*, 2003b.

Deterre *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Tomiyama *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Los dos primeros aldehídos proporcionan un aroma a grasa, al igual que el 1-decanol, mientras el pentadecanal aporta un aroma floral (Chisholm *et al.*, 2003b, Cornell University, 2004; Miyazawa *et al.*, 2010).

Así pues, el flavedo de la variedad Clemenpons parece más rico en compuestos terpénicos que el flavedo de la variedad Clemenules, en concreto más rico en mono y sesquiterpenos, los cuales le pueden proporcionar a dicho flavedo mayores notas aromáticas de limón, madera, pino y alcaravea, la cual recuerda al anís. Dado que los compuestos terpénicos derivan de la vía del ácido mevalónico (Bruneton, 2001), parece que esta vía estuviese más potenciada en la variedad Clemenpons que en Clemenules. A su vez el flavedo de la variedad Clemenules se muestra más rico en compuestos alifáticos aldehídicos y alcohólicos de cadena de más de siete átomos de carbono, que suelen aportar unas notas aromáticas de grasa, musgo y florales. Estos compuestos alifáticos proceden de la oxidación de los ácidos grasos, por lo que este proceso de oxidación de lípidos parece más potenciado en la variedad Clemenules que en

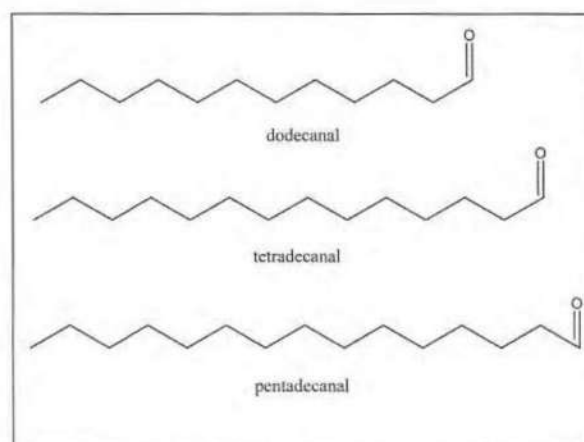


Figura 11. Aldehídos alifáticos identificados.

Clemenpons (Bruneton, 2001). Para confirmar estos matices olfativos (más hacia limón y alcaravea en el caso de Clemenpons y más hacia flores y grasa para Clemenules) sería necesario realizar un estudio complementario empleando un olfactómetro acoplado al cromatógrafo de gases, ya que la nariz humana no tiene por qué apreciar necesariamente las variaciones de concentración de los compuestos volátiles que hemos determinado en este trabajo. No obstante, el hecho de haber conseguido diferenciar los frutos de dos variedades tan semejantes como Clemenules y Clemenpons a través del análisis de los compuestos volátiles del aceite esencial, viene a confirmar que este tipo de análisis es útil para diferenciar entre sí variedades de clementinas que genéticamente son muy difíciles de distinguir.

CONCLUSIONES

Tras el estudio comparativo de los compuestos volátiles que constituyen los aceites esenciales del flavedo de los frutos de las variedades Clemenules y Clemenpons, cultivadas ambas en zonas de clima mediterráneo, se puede concluir lo siguiente:

- El perfil volátil de los aceites esenciales de ambas variedades presenta diferencias que permiten distinguir ambos tipos de frutos, lo cual no había sido posible hasta el momento a través de ninguna característica morfológica de dichos frutos.

- Los aceites esenciales de ambas variedades presentan diferencias cuantitativas, no cualitativas, es decir, ambos presentan los mismos compuestos pero no en la misma concentración.

- El flavedo de la variedad Clemenules parece más rico en algunos monoterpenos, como por ejemplo los compuestos 3-careno o *trans*-carveol, y en sesquiterpenos como el α -humuleno.

- El flavedo de la variedad Clemenules parece más rico en compuestos alifáticos de cadena superior a 7 átomos de carbono, como el alcohol 1-octanol y el aldehído dodecanal.

AGRADECIMIENTOS

A Rafael Bono Úbeda, por su motivación para la realización de este trabajo. A Juan Platero, por su ayuda para la recogida de las muestras en el IVIA. A la química Clara Lahore por integrar los picos de algunos compuestos en los cromatogramas de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Bourgou S., Rahali F.Z., Ourghemmi I., Tounsi M.S. 2012. Changes of peel essential oil composition of four Tunisian Citrus during fruit maturation. *The Scientific World Journal*, doi: 10.1100/20127528593.
Boussaada O., Chemli R. 2007. Seasonal variation of essential oil composition of *Citrus aurantium* L. var. amara. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10, 109-120.

Bruneton J. 2001. *Farmacognosia. Fitoquímica, Plantas Medicinales*. Ed. Acribia S.A. 2ª edición. Zaragoza, 1099 pp.
Cheong M-W., Liu S-Q., Yeo J., Chionh H-K., Pramudya K., Curran P., Yu B. 2011. Identification of aroma-active compounds in Malaysian pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peel by Gas Chromatography-Olfactometry. *Journal of Essential Oil Research*, 23, 34-42.
Chisholm M.G., Jell J.A., Cass Jr. D.M. 2003a. Characterization of the major odorants found in the peel oil of *Citrus reticulata* Blanco cv. Clementine using gas chromatography-olfactometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 275-281.
Chisholm M.G., Wilson M.A., Gaskey G.M. 2003b. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 106-115.
Chutia M., Bhuyan P.D., Pathak M.G., Sarma T.C., Boruah P. 2009. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology*, 42, 777-780.
Cornell University, 2004. *Flavornet and human odor space, Gas chromatography-olfactometry (GCO) of natural products*. Geneva, Nueva York, USA, visto el 4 de Mayo de 2015, <http://www.flavornet.org/flavornet.htm>
Costa R., Bisignano C., Filocamo A., Grasso E., Occhiuto F., Spadaro F. 2014. Antimicrobial activity and chemical composition of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle essential oil from Italian organic crops. *Journal of Essential Oil Research*, 26, 400-408.
Deterre S., Rega B., Delarue J., Decloux M., Lebrun M., Giampaoli P. 2012. Identification of key aroma compounds from bitter orange (*Citrus aurantium* L.) products: essential oil and macerate-distillate extract. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 77-88.
Dugo G., Cotroneo A., Verzera A., Bonaccorsi I. 2002. Composition of the volatile fraction of cold-pressed citrus peel oils, páginas 201-317. In *Citrus. The genus Citrus*. Editado por G. Dugo y A. Di Giacomo. Taylor & Francis, Londres y Nueva York.
Fanciullino A.L., Tomi F., Luro F., Desjober J.M., Casanova J. 2006. Chemical variability of peel and leaf oils of mandarins. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 359-367.
González-Mas M.C., Escribete M.D., Jover S., Bermejo A., Cano A., Gutiérrez-Suanzes A. 2010. Estudio del aceite esencial de Clementinas: Diferenciación de variedades según el perfil volátil de la corteza. *Levante Agrícola*, especial Postcosecha, 401, 185-192.
Högnadottir, Á., Rouseff, R.L. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 998, 201-211.
Jolliffe I.T. 2002. *Principal Component Analysis*. Ed. Springer. 2ª edición, Nueva York. 487 pp.
Lan Phi N.T., Nishiyama C., Choi H-S., Sawamura M. 2006. Evaluation of characteristic aroma compounds of *Citrus natsudaidai* Hayata (Natsudaidai) cold-pressed peel oil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 1832-1838.
Liu C., Cheng Y., Zhang H., Deng X., Chen F., Xu J. 2012. Volatile constituents of wild Citrus Mangshanyegan (*Citrus nobilis* Lauri) peel oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2617-2628.
Liu C., Yan F., Gao H., He M., Wang Z., Cheng Y., Deng X., Xu J. 2015. Features of citrus terpenoid production as revealed by carotenoid, limonoid and

aroma profiles of two pummelos (*Citrus maxima*) with different flesh color. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 111-119.

Lota M-L., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J. 2001. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 77-104.

Merle H., Morón M., Blázquez M.A., Boira H. 2004. Taxonomical contribution of essential oils in mandarins cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 491-497.

Minh Tu N.T., Thanh L.X., Ueda A., Ueda H., Sawamura M. 2002. Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 169-174.

Miyazawa N., Fujita A., Kubota K. 2010. Aroma character impact compounds in Kinokuni mandarin orange (*Citrus kinokuni*) compared with Satsuma mandarin orange (*Citrus unshiu*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 835-842.

Njoroge S.M., Koaze H., Karanja P.N., Sawamura M. 2005. Volatile constituents of redblush grapefruit (*Citrus paradisi*) and pummelo (*Citrus grandis*) peel essential oils from Kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9790-9794.

Omori H., Nakahara K., Umano K. 2011. Characterization of aroma compounds in the peel extract of Jabara (*Citrus jabara* Hort. Ex Tanaka). *Flavour and Fragrance Journal*, 26, 396-402.

Ruberto G., Renda A., Piattelli M., Rapisarda P., Starrantino A. 1997. Essential oil of two new pigmented citrus hybrids *Citrus clementina* x *Citrus sinensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 467-471.

Soler Aznar J., Soler Fayos G., Forner Giner M.A., Forner Valero J. 2006. *Criterios para identificar variedades y patrones de cítricos*. Ed. Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació Press. Valencia, 156 pp.

Tanaka T. 1961. Citologia: Semi-centennial Commemoration Papers on Citrus Studies. Citologia Supporting Foundation: Osaka, Japan; 114.

Tomiyama K., Aoki H., Oikawa T., Sakurai K., Kasahara Y., Kawakami Y. 2012. Characteristic volatile components of Japanese sour citrus fruits: Yuzu, Sudachi and Kabosu. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 341-355.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Alvárez J.A. 2009. Chemical composition of Mandarin (*C. reticulata* L.), Grapefruit (*C. paradisi* L.), Lemon (*C. limon* L.) and Orange (*C. sinensis* L.) essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12, 236-243.

Wang J., Liu Y. 2014. Comparative study on the volatiles in *Citrus reticulata* 'Dahongpao' peel from the same plant and their antioxidant activities. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17, 303-308.

Wu Z., Li H., Yang Y., Zhan Y., Tu D. 2013. Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity. *Industrial Crops and Products*, 46, 311-316.